



16 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 44 07 338 A 1

21 Aktenzeichen: P 44 07 338.0  
22 Anmeldetag: 2. 3. 94  
43 Offenlegungstag: 7. 9. 95

51 Int. Cl. 9:  
A 61 K 49/00  
A 61 K 39/395  
A 61 K 31/70  
A 61 K 38/22  
H 01 F 1/28  
A 61 K 33/26  
// C07F 7/18, C07C  
323/12, G01N 24/06

DE 44 07 338 A 1

71 Anmelder:

Silica Gel GmbH Adsorptions-Technik, Apparatebau,  
14050 Berlin, DE; Pilgrim, Herbert, Dr., 14169 Berlin,  
DE

72 Vertreter:

H. Felke und Kollegen, 10367 Berlin

61 Zusatz zu: P 43 09 333.7

72 Erfinder:

Pilgrim, Herbert, Dr., 14169 Berlin, DE

54 Superparamagnetische Teilchen und deren Verwendung

57 Die Erfindung betrifft superparamagnetische Teilchen, die aus Aggregaten von superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxiden, Eisenmischoxiden oder Eisen bestehen und die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen chemisch gebunden haben, die gegebenenfalls weitere Bindungsstellen zur Kopplung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, diagnostischen oder pharmakologisch wirksamen Substanzen besitzen. Erfindungsgemäß bestehen die superparamagnetischen Teilchen aus

- (a) stabilen, abbaubaren Aggregaten mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer mit definiertem Verhalten im Magnetfeld, wobei die Aggregate
- (b) aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid, Eisenmischoxid oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 nm bestehen, nach Patent (Patentanmeldung P 4309333.7) und sind dadurch gekennzeichnet, daß sie (c) auf ihrer Oberfläche silikatgruppenhaltige anorganische und/oder organische Substanzen, polycarbonsäurehaltige Kohlenhydrate und/oder mercaptogruppenhaltige organische Substanzen chemisch gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen aufweisen können.

DE 44 07 338 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Die Erfindung betrifft superparamagnetische Teilchen, die aus Aggregaten von superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxiden, Eisenmischoxiden oder Eisen bestehen und die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen chemisch gebunden haben, die gegebenenfalls weitere Bindungsstellen zur Kopplung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, diagnostischen oder pharmakologisch wirksamen Substanzen besitzen, nach Patent (Patentanmeldung P 43 09 333.7).

Im Hauptpatent werden superparamagnetische Teilchen beschrieben, die aus stabilen abbaubaren Aggregaten mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer bestehen, mit definiertem Verhalten im Magnetfeld, wobei die Aggregate aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer bestehen, die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, thiophosphat-, phosphonat- oder thiophosphonatgruppenhaltige Polyalkylenglykole, phosphatgruppenhaltige Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere sowie phosphatgruppenhaltige Kohlehydrate chemisch gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen haben können.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Bereich der Substanzen, die an der Oberfläche der Eindomänenteilchen oder der superparamagnetischen Teilchen gebunden sein können, zu erweitern, wobei diese Verbindungsgruppen stabil und leicht herstellbar sein sollen.

Erfindungsgemäß erfolgt die Stabilisierung der Magnetteilchen durch eine chemische Bindung von silikatgruppen- und/oder mercaptogruppenhaltigen Stabilisatorsubstanzen auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen.

Die Stabilisatorsubstanz muß so beschaffen sein, daß sie mit Wasser mischbar ist und den Magnetteilchenabstand so groß hält, daß die kinetische Energie der Magnetteilchen größer als die magnetische Wechselwirkungsenergie ist.

Die Stabilisatorsubstanzen können ausgewählt werden unter den folgenden Substanzen:

- (i) den silikatgruppenhaltigen anorganischen Substanzen der Orthokieselsäure und der Kondensationsprodukte, wobei hier zur Stabilisierung der superparamagnetischen Teilchen Natrium- oder Kaliumsilikatlösung oder alkalische Lösungen von Alkalisilikaten mit kondensationsfähigen Hydroxoaluminaten verwendet werden;
- (ii) den silikatgruppenhaltigen organischen Substanzen der allgemeinen Formel



worin

X eine reaktive funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal-, Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonat-, Alkoxy-, Alkylamino- und Alkylthiogruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxy- und der Alkylgruppe ausgewählt ist im Bereich von 1 bis 4;

R fehlt oder

R ist ein Polyalkylenglykol, ausgewählt unter Polyethylenglykolen (PEG)n, mit Wasser mischbaren Polypropylenglykolen (PPG)n oder mit Wasser mischbaren Block-Copolymerisaten aus Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten (PEG)a-(PEG)b, (PEG)a-(PPG)b-(PEG)a, (PPG)b-(PEG)a-(PPG)b wobei a eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 100 und b eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 20 darstellt; n ist eine positive ganze Zahl, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 300, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Blockcopolymerisat im Bereich von 3 bis 140; oder

R ist ein Kohlehydrat, wobei die Kohlehydratreste aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Maltotriose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridenylsäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure, Alginsäure bestehen;

B ist eine Silantriol- oder eine Trialkoxysilangruppe, bei der die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxygruppe im Bereich von 1 bis 4 liegt.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen sind  $\omega$ -Ethylaminopolyethylenglykol-trimethoxysilan (MG des PEG ca. 1000),  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol-trimethoxysilan (MG des PEG ca. 750) oder  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol-polypropylenglykol-thioethyltriethoxysilan, hergestellt aus Polyglykol M41/40 (Hoechst),  $\omega$ -Hydroxypolyethylenglykol-silanol, 3-Chlorpropyltri-methoxysilan, 2-Mercaptopropyl-triethoxysilan, 3-Aminopropyl-triethoxysilan, 3-(2-Aminoethylamino)propyl-triethoxysilan, Vinyltriethoxysilan, Vinyltri(methoxyethoxy)silan, Methacryloxypropyl-trimethoxysilan, oder Poly-trialkoxysilyl-Stärke, Polytrialkoxysilyl-Dextran, Poly-trialkoxysilyl-Dextrin.

Bei der Stabilisierung der superparamagnetischen Teilchen mit Polyalkylenglykol-trialkoxysilanen erfolgt in der wäßrigen Dispersion eine Abspaltung der Alkoxygruppen unter Bildung der eigentlichen Stabilisatorsubstanz Polyalkylenglykol-silanol oder Kohlehydrat-polysilantriol und den entsprechenden Alkoholen, gegebenenfalls unter Erhöhung der Temperatur oder Zugabe von Säuren.

Die Stabilisatorsubstanzen können weiterhin ausgewählt werden unter

- (iii) den organischen mercaptogruppenhaltigen Substanzen der allgemeinen Formel



worin

X eine reaktive funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal-, Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonat-, Alkoxy-, Alkylamino- und Alkylthiogruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxy- und der Alkylgruppe

ausgewählt ist im Bereich von 1 bis 4;

R ist ein organischer Rest; aus Polyalkylenglykol, bestehend aus einer Polyethylenglykolgruppe (PEG)<sub>n</sub>, einer mit Wasser mischbaren Polypropylenglykolgruppe (PPG)<sub>n</sub> oder einem mit Wasser mischbaren Block-Copolymerisat aus Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten (PEG)<sub>a</sub>-(PPG)<sub>b</sub>-(PEG)<sub>a</sub>, (PPG)<sub>b</sub>-(PEG)<sub>a</sub>-(PPG)<sub>b</sub>, wobei a eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 100 und b eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 20 darstellt; n ist eine positive ganze Zahl, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 300, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Blockcopolymerisat im Bereich von 3 bis 140;

R ist ein Kohlehydrat, wobei die Kohlehydratreste aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Maltotriose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktoseane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridenylsäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure, Alginsäure bestehen;

oder X-R-SH ist Mercaptopurin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymine, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und deren Mercapto-desoxynucleoside.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für Polyalkylenglykothiole sind  $\omega$ -Amino-polyethylenglykol-thiol (MG des PEG ca. 1000),  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol-thiol (MG des PEG ca. 1000) oder  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykopolypropylenglykol-thiol, hergestellt aus Polyglykol M41/40 (Hoechst).

Die Stabilisatorsubstanzen können weiterhin ausgewählt werden unter

(iv) den polycarbonsäuregruppenhaltigen Kohlehydraten, wobei die Kohlehydratreste aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Maltotriose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktoseane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridenylsäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure, Alginsäure bestehen, und die polycarbonsäuregruppenhaltigen Kohlehydrate noch weitere reaktive funktionelle Gruppen besitzen können, die ausgewählt sind unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal Epoxy-, Thiol-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonatgruppe.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für polycarbonsäuregruppenhaltige Kohlehydrate sind Polycarboxyl-Dextran, Polycarboxyl-Dextrin, Polycarboxyl-Stärke.

Erfindungsgemäß können an die mit der superparamagnetischen Teilchenoberfläche gebundenen Stabilisatorsubstanzen gewebespezifische Bindungssubstanzen oder pharmakologisch wirksame Substanzen gekoppelt

werden, wenn die Stabilisatorsubstanzen wenigstens zwei chemisch reaktive funktionelle Gruppen tragen, wobei die Silantriol- und die Mercaptogruppe für die chemische Bindung zu den superparamagnetischen Teilchen dienen und die restlichen reaktiven funktionellen Gruppen, die z.B. aus Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonatgruppen bestehen, für die Bindung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksamen Substanzen und pharmakologisch wirksamen Zellen dienen.

Gewebespezifischen Bindungssubstanzen sind z.B. Antigene, Antikörper, Haptene, Protein A, Protein G, Endotoxin-bindende Proteine, Lectine, Selectine.

Pharmakologisch wirksamen Substanzen sind z.B. Antitumorproteine, Enzyme, Antitumorenzyme, Antibiotika, Pflanzenschutzmittel, Alkylierungsreagenzien, Antimetaboliten, Hormone und Hormonantagonisten, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren, Endotoxine, Lymphotoxine, Urokinase, Streptokinase, Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex, Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren, Desmoplastin-Plasminogen-Aktivatoren, Makrophagen-Aktivierungskörper, Antisera, Proteaseninhibitoren, radioaktiv Phosphor <sup>32</sup>P enthaltene Stabilisatorsubstanzen oder Tenside.

Pharmakologisch wirksame Zellen sind z.B. Organellen, Viren, Mikroben, Algen, Pilze, insbesondere Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Langerhans'sche Inseln.

Pharmakologisch wirksame Komplexbildner sind z.B. Polycarbonsäuren, Amino-carboxysäuren, Porphyrine, Katecholamine.

Die Toxizität solcher pharmakologisch wirksamen Substanzen kann dabei relativ hoch sein, da die Magnetischen sich aufgrund ihrer gewebespezifischen Wechselwirkung bevorzugt an den entsprechenden Bindungsorten anreichern oder durch magnetisches drug targeting zum Wirkungsort transportiert und angereichert werden. Die Dosis der pharmakologisch wirksamen Substanzen kann gering gehalten werden, da sich die Substanz am Wirkungsort konzentriert und der übrige Körper nur gering belastet wird.

Die Kopplung pharmakologisch wirksamer Substanzen an die superparamagnetischen Teilchen hat weiterhin den Vorteil, daß über die Relaxationszeitverkürzung der resonanzfähigen Wasserstoffatome im Körper der Therapiefortschritt mit der Kernspin-Diagnostik beobachtet werden kann.

Die Herstellung der superparamagnetischen Teilchen erfolgt durch eine gezielte Agglomeration von superparamagnetischen Eindomänenteilchen. Dabei werden die superparamagnetischen Eindomänenteilchen in Wasser verrührt und bei einem pH-Wert von 3 bis 7 durch Erhitzen auf 80 bis 120°C, bei Temperaturen über 100°C im Autoklaven, zur Aggregation gebracht.

Nach dem Abkühlen der Dispersion werden die Teilchen so lange gewaschen, bis die elektrische Leitfähigkeit des Filtrates < 10  $\mu$ S/cm beträgt. Die so hergestellten superparamagnetischen Teilchen bilden sofort einen schnell sedimentierenden Niederschlag, der sich auch durch starkes Rühren oder durch Ultraschallbehandlung nicht in eine stabile Dispersion überführen läßt. Erst die chemische Bindung von silantriol- und/oder mercaptogruppenhaltigen Stabilisatorsubstanzen auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen sorgt für eine schnelle Dispergierung, bei einigen Stabi-

lisatorsubstanzen sogar schon bei leichtem Rühren mit dem Glasstab.

Je nach Anwendungsgebiet können die magnetischen Dispersionen dialysiert werden, um den überschüssigen Anteil an Stabilisatorsubstanz zu entfernen. Vor allen Dingen bei chemisch reaktiven superparamagnetischen Teilchen, die zur Kopplung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen und pharmakologisch wirksamen Substanzen verwendet werden sollen ist eine Dialyse notwendig.

Die stabilisierten superparamagnetischen Teilchendispersionen enthalten die noch nicht oder nur schwach aggregierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen. Diese bilden eine stabile magnetische Flüssigkeit, die sich leicht von den größeren superparamagnetischen Teilchen durch eine Sedimentation in einem Magnetfeld entsprechender Stärke und Inhomogenität abtrennen lassen.

In einer einfachen Ausführung der magnetischen Separation stellt man ein Becherglas mit der magnetischen Dispersion auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 mT und gießt nach einer Sedimentationszeit von ca. 30 min die überstehende magnetische Flüssigkeit ab. Zurück bleiben die superparamagnetischen Teilchen, die, je nach Teilchengröße, sich wieder spontan in der Dispersion verteilen oder als Bodensatz im Becherglas zurückbleiben. Bis zu Teilchengrößen von ungefähr 500 nm verteilen sich die superparamagnetischen Teilchen wieder spontan oder unter leichtem Rühren im wäßrigen Dispersionsmittel. Größere superparamagnetische Teilchen als ca. 500 nm können leicht durch stärkeres Rühren oder Ultraschallbehandlung dispergiert werden. Die Sedimentationsstabilität der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen ist wesentlich höher als bei den bisher bekannten Magneteilchen mit vergleichbaren magnetischen Eigenschaften, was wahrscheinlich auf die starke Strukturierung der superparamagnetischen Teilchen umgebenden Wassermoleküle und den damit vergrößerten Stokes'schen Teilchendurchmesser zurückzuführen ist.

Die magnetischen Eigenschaften der superparamagnetischen Teilchen sind aufgrund des geringen Anteils an Stabilisatorsubstanz stärker als bei den bisher bekannten Magneteilchen. Da der Anteil an superparamagnetischen Eindomänenteilchen wesentlich höher als bei den bisher bekannten Magneteilchen ist, ist auch die Abscheidungs geschwindigkeit der superparamagnetischen Teilchen in einem inhomogenen Magnetfeld größer. In einer 10 Gew.-%igen wäßrigen Dispersion von superparamagnetischen Teilchen, mit einem Durchmesser von ca. 100 nm und einem Magnetanteil von 95%, beträgt die Abscheidungszeit der Magneteilchen auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 mT weniger als 1 min.

Die erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen haben Eisenoxidgehalte von 90 bis 98 Gew.-%. Gegenüber dem Stand der Technik, daß Magneteilchen bis zu 50 Gew.-% Eisenoxid enthalten können, bedeutet das eine wesentliche Verbesserung der magnetischen Eigenschaften. Damit können die neuen superparamagnetischen Teilchen, bei gleichen magnetischen Wechselwirkung, entsprechend kleiner als die bisher bekannten Magneteilchen sein. Die spezifische Oberfläche vergrößert sich, es können mehr pharmakologisch wirksame Substanzen oder gewebespezifische Bindungssubstanzen auf der Oberfläche gekoppelt werden. Mit Verkleinerung der Teilchengröße wird auch die biologische Verträglichkeit besser, die Abbaugeschwindig-

keit im Körper erhöht. Auch die freie verfügbare Zeit der Magneteilchen beim magnetischen drug targeting, d. h. die Zeit bis die Teilchen vom retikuloendothelialen System gebunden sind, erhöht sich mit Verringerung der Teilchengröße.

Die Bioverfügbarkeit der superparamagnetischen Teilchen im Körper beträgt, je nach Teilchengröße und Zusammensetzung der Stabilisatorsubstanzen nur wenige Minuten bis einige Stunden d. h. das retikuloendotheliale System bindet die superparamagnetischen Teilchen relativ schnell.

An der Phasengrenze zwischen den superparamagnetischen Teilchen und diamagnetischen Zellen treten mechanische Kräfte auf, die proportional der Permeabilitätsdifferenz der sich berührenden Materialien und dem Quadrat der wirkenden Magnetfeldstärke sind.

Da die erfindungsgemäßen Teilchen einen sehr hohen Anteil an superparamagnetischen Teilchen besitzen und die Stabilisatorsubstanz nur eine momomolekulare Schicht von wenigen Nanometern Dicke besitzt, treten an den Phasengrenzen zu diamagnetischen Zellen Kräfte auf, die zur Schädigung der Zellen führen können. Diese Kräfte können z. B. bei der Anreicherung der superparamagnetischen Teilchen in Tumoren, zu einer Tumorschädigung führen. Dieser magnetomechanische Effekt könnte auch dazu führen, daß bei einer starken Wechselwirkung zwischen der Stabilisatorsubstanz der superparamagnetischen Teilchen und dem Tumorgewebe, Oberflächenmoleküle des Tumorgewebes von den superparamagnetischen Teilchen gebunden und herausgezogen werden. Wenn diese superparamagnetischen Teilchen von den Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden, können die Oberflächenmoleküle des Tumors als Antigen erkannt werden, auch wenn sie sonst nicht vom Immunsystem als Antigen identifiziert worden wären. Es kann eine mehr oder weniger starke Immunantwort des Körpers auf die Oberflächenmoleküle des Tumors und damit eine Schädigung des Tumors auftreten.

Außerdem bewirken Polyethylenglykole in Konzentrationen über 25 Gew.-%, wie sie in noch höheren Konzentrationen in den Stabilisatorsubstanzschichten der superparamagnetischen Teilchen auftreten, ZellulSIONen, was bei einer Anreicherung der polyethylenglykolhaltigen superparamagnetischen Teilchen in Tumoren zu einer weiteren Schädigung des Tumorgewebes führen kann.

Die Stabilisatorsubstanzen sind nach dem Stand der Technik leicht herzustellen.

Die Herstellung der silikatgruppenhaltigen organischen Substanzen erfolgt z. B. durch Reaktion von lithium- oder natriumorganischen Verbindungen der allgemeinen Formel

$X-R-Li$  bzw.  $X-R-Na$  mit Tetraalkoxysilanen oder Trialkoxychlorosilanen (siehe Houben-Weyl, Bd. XII/5, S. 180 ff. (1980)). Eine weitere einfache Möglichkeit zur Herstellung silikatgruppenhaltiger organischer Verbindungen ist die Umsetzung der  $X-R$ -(p-Toluolsulfonate) mit z. B. 2-Mercaptopropyltriethoxysilan, 3-Aminopropyltriethoxysilan im alkalischen Medium (siehe K. Nilsson, K. Mosbach; Eur. J. Biochem. 112, 397-409 (1980)).

Die Herstellung der mercaptogruppenhaltigen organischen Substanzen erfolgt z. B. aus den  $X-R$ -Halogen-Verbindungen durch Umsetzung mit Thioharnstoff und nachfolgender alkalischer Hydrolyse zu den entsprechenden Mercaptoverbindungen (siehe Houben-Weyl, Bd. IX, S. 3 ff. (1955), Bd. E2, X1 E, S. 32 ff. (1985)).

Die Herstellung der polycarbonsäuregruppenhaltigen Kohlehydrate erfolgt durch Oxidation der Kohlehydrate z. B. mit Kaliumpermanganat, Eisen(II)-salzen/Wasserstoffperoxid, Perjodsäure (siehe A.H. Haines, Hrsg., Methods for the Oxidation of Organic Compounds, Academic Press, London, 1988).

Die Herstellung der silikatgruppenhaltigen anorganischen Kondensationsprodukte erfolgt durch einfaches Mischen von Natriumsilikatlösung mit z. B. Natriumaluminat.

An Beispielen soll die Herstellung der erfindungsgemäßigen superparamagnetischen Teilchen erläutert werden.

#### Beispiel 1

Eisen(III)-chlorid (270 g) und Eisen(II)-Chlorid (119 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Ammoniakwasser wird unter Rühren der pH-Wert der Lösung Dispersion mit Salzsäure auf den pH 6,0 eingestellt; und die Dispersion auf 100°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag mit dest. Wasser gewaschen, bis die elektrische Leitfähigkeit < 10 µS/cm beträgt. Die gebildeten superparamagnetischen Teilchen bestehen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Sie können stabilisiert werden.

#### Beispiel 2

Eisen(III)-chlorid (270 g) und Eisen(II)-sulfat (153 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Ammoniakwasser wird unter Rühren der pH-Wert der Lösung auf 9,0 eingestellt. Nach erfolgter Fällung wird die Dispersion unter Rühren mit Salzsäure auf pH 5,0 eingestellt und mit 25%iger Wasserstoffperoxidlösung (22 ml) versetzt und 30 min auf 80°C erwärmt. Nach dem Abkühlen der Dispersion wird der Niederschlag gewaschen bis die elektrische Leitfähigkeit < 10 µS/cm beträgt. Die entstandenen superparamagnetischen Teilchen sind aus  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  und können stabilisiert werden.

Die Stabilisierung der superparamagnetischen Teilchen erfolgt durch Mischen einer wäßrigen oder niedrigsiedende polare Lösungsmittel enthaltenden Stabilisatorlösung mit den Magnetteilchen bei Raumtemperatur. Die Stabilisatorlösung kann dabei, je nach den gewünschten Eigenschaften, aus reinen Stabilisatorsubstanzen oder aus Mischungen von Stabilisatorsubstanzen bestehen. Zur Beschleunigung der Dispergierung und Stabilisierung kann die Dispersion gerührt oder mit Ultraschall behandelt werden. Kommen niedrigsiedende organische Lösungsmittel zur Anwendung, werden diese zur Entfernung nach der Stabilisierung durch Vakuumverdampfung oder Dialyse entfernt.

An einigen Beispielen soll die Stabilisierung der superparamagnetischen Teilchen erläutert werden.

#### Beispiel 3

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 50 g einer 5%igen Natrium-silikatlösung in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min gerührt. Die entstehende Dispersion wird 30 min auf einem Permanentmagneten mit einer magnetischen Fluidichte von 0,1 T sedimentiert und der überstand von magnetischer Flüssigkeit abgesaugt. Das Sediment auf dem Magnetfeld enthält die superparamagnetischen Teilchen. Durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser und erneuter Sedimentation im Magnetfeld können die superparamagnetischen Teilchen rein

und in enger Teilchengrößenverteilung erhalten werden. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 120 nm.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind sehr gut für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Hier können sie durch magnetomechanische Immunstimulierung oder zusätzlich durch Hyperthermie, d. h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors, den Tumor zerstören. Die superparamagnetischen Teilchen sind auch als Orthes oder i.v. Kontrastmittel für die MRI anwendbar.

#### Beispiel 4

Die gesamte Menge des  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Niederschlages von Beispiel 2 wird in eine Lösung von 20 g 3-Mercaptopropyl-trimethoxysilan in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert.

Die entstehenden superparamagnetischen Teilchen haben einen Durchmesser von 310 nm. Die Dispersion wird gegen dest. Wasser dialysiert und durch ein 0,45 µm-Filter filtriert. Das entstehende Produkt ist: für die Kopplung von monoklonalen Antikörpern anwendbar.

#### Beispiel 5

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 40 g  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykoltrimethoxysilan (Molekulargewicht: 1000) in 500 ml Wasser gegeben und 10 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung), unter Erwärmen auf 70°C, dispergiert. Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 3 beschrieben.

An die Polyalkylenglykolgruppen-haltigen superparamagnetischen Teilchen lassen sich auch diarmatische Polyalkylengruppen-haltige pharmakologisch wirksame Substanzen adsorptiv binden, wobei letztere Substanzen beim magnetischen drug targeting, unter der Einwirkung eines inhomogenen Magnetfeldes, wieder von der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen desorbiert werden. Erfolgt eine adsorptive Bindung von z. B. Doxorubicin-Monopolyethylenglykol-phosphat an Teilchen nach Beispiel 5, so kann diese Produkt für ein magnetisches drug targeting von Zytostatika in der Tumorthherapie eingesetzt werden.

#### Beispiel 6

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 45 g  $\omega$ -Octoxy-polyethylenglykolsilantriol (Molekulargewicht ca. 1800) in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung) dispergiert. Die entstehende Dispersion wird mit einem 50 kD-Filter gegen dest. Wasser dialysiert um überschüssige Stabilisatorsubstanzen zu entfernen.

Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 3 beschrieben. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 180 nm.

Die nach Beispiel 6 hergestellten superparamagnetischen Teilchen sind für viele Kopplungsreaktionen ver-

wendbar, bei denen die Reaktivität der Aldehydgruppe Anwendung finden kann. So z. B. für die Kopplung von aminogruppenhaltigen pharmakologisch wirksamen Substanzen, wie Streptokinase oder Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex.

#### Beispiel 7

10 ml der Dispersion von Beispiel 6, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, werden mit 30 mg Anistreplase gemischt und 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting zur Auflösung von Blutgerinnseln geeignet.

#### Beispiel 8

10 ml der Dispersion von Beispiel 6, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, werden mit 10 ml einer 10 mg DOXORU-BICIN enthaltenden Lösung gemischt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting in der Tumorthherapie anwendbar.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet und das tumorschädigende Zytostatikum kann in erhöhter Konzentration auf den Tumor einwirken. Zusätzlich kann eine Tumorschädigung durch Hyperthermie, d. h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors vorgenommen werden.

Magnetfelder können die Wirksamkeit der Immunstimulierung erhöhen.

#### Beispiel 9

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlags von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 25 g einer Mischung aus 70% Natriumsilikat und 30% Natriumaluminat in 500 ml Wasser gegeben und 10 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung, unter Erwärmen auf 70°C, dispergiert. Nach dem Neutralisieren der Dispersion mit verd. Salzsäure auf einen pH-Wert von 7, erfolgt die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 3 beschrieben. Diese superparamagnetischen Teilchen sind als orales Kontrastmittel für den gastro-intestinalen Bereich anwendbar.

Die superparamagnetischen Teilchen können auch, gekoppelt mit Tensiden, Zellmembranen zerstören und so eine Zellschädigung in vitro und in vivo hervorrufen. Als Tenside können z. B. Nonylphenol-polyethylen glykol-phosphat, Alkyl- oder Alkylarylpolylethylenglykolsulfate (Zahl der Ethylenoxydgruppen zwischen 5 und 40) Anwendung finden.

Das Hauptanwendungsgebiet der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen liegt auf dem Gebiet des magnetischen drug targeting. Aufgrund der sehr hohen Anteile an Magnetmaterial (90 bis 98 Gew.-%) lassen sich schon kleine Magnetteilchen sehr gut und sehr schnell in bestimmte Regionen des Körpers mit Hilfe von elektromagnetischen oder Permanentmagnet-Feldern konzentrieren. Bei Kopplung von pharmakologisch wirksamen Substanzen an die superparamagnetischen Teilchen, kann deren Konzentration am Wirkungsort drastisch erhöht werden. Dieser Umstand hat für die Krebstherapie besondere Bedeu-

tung, da die zur Chemotherapie von Tumoren eingesetzten Substanzen sehr starke Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus ausüben und bei einer Anreicherung am Wirkungsort der übrige Körper weniger stark mit Zytostatika belastet wird.

Die superparamagnetischen Teilchen können durch Kopplung an Viren, Zellen und deren Oberflächenmolekülen zur Immunaktivierung im Körper eingesetzt werden, wobei die Einwirkung von Magnetfeldern die Immunaktivierung unterstützt.

Die superparamagnetischen Teilchen können auch als Kontrastmittel für Kernspin-Diagnostik eingesetzt werden.

Die Konzentration der einzusetzenden superparamagnetischen Teilchen ist beim magnetischen drug targeting abhängig von der Teilchengröße, von der Zusammensetzung der Stabilisatorsubstanzen, von der magnetischen Feldstärke am Wirkungsort und wie groß die Entfernung von der Injektionsstelle zum Wirkungsort ist. Um eine Nekrose eines Tumores bei Nacktmäusen zu erreichen, ist eine Menge an Injektionsflüssigkeit von ca. 0,01 bis 0,2 Vol-% des Blutvolumens notwendig, wobei die magnetischen Sättigungsinduktion bei ca. 5 mT liegt.

Die Mengen an superparamagnetischen Teilchen liegen bei der Anwendung als Kontrastmittel für die MRI bei ca. 0,001 Vol-% des Blutvolumens, wenn die magnetische Sättigungsinduktion bei ca. 5 mT liegt.

Die reaktiven superparamagnetischen Teilchen können auch zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden, wenn auf der Oberfläche der Teilchen die entsprechenden diagnostischen Substanzen chemisch gebunden werden. Aufgrund der starken magnetischen Wechselwirkung mit Magnetfeldern, lassen sich auch sehr kleine superparamagnetische Teilchen nach erfolgter diagnostischer Reaktion leicht aus dem Reaktionsgemisch wieder abtrennen.

#### Patentansprüche

1. Superparamagnetische Teilchen, bestehend aus
  - (a) stabilen, abbaubaren Aggregaten mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer mit definiertem Verhalten im Magnetfeld, wobei die Aggregate
  - (b) aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer bestehen, nach Patent (Patentanmeldung P 43 09 333/7), dadurch gekennzeichnet, daß sie
  - (c) auf ihrer Oberfläche silikatgruppenhaltige anorganische und/oder organische Substanzen, polycarbonsäurehaltige Kohlenhydrate und/oder mercaptogruppenhaltige organische Substanzen chemisch gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen aufweisen können.
2. Superparamagnetische Teilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchengröße der superparamagnetischen Eindomänenteilchen (b) im Bereich von 3 bis 20 nm liegt; und die Teilchengröße der superparamagnetischen Teilchen (a) im Bereich von 10 bis 1000 nm.
3. Superparamagnetische Teilchen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die superparamagnetischen Eindomänenteilchen (b) aus  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , aus den Eisenmischoxiden der all-

gemeinen Formel  $MO \cdot Fe_2O_3$ , worin M die zweiwertigen Metalle Fe, Mg, Be, Mn, Zn, Co, Ba, Sr, Cu oder Gemische davon bedeuten, aus den Mischoxiden; der allgemeinen Formel  $mFe_2O_3 \cdot nMe_2O_3$ , worin Me die dreiwertigen Metalle Al, Cr, seltene Erdmetalle oder Gemische davon bedeuten, oder Eisen bestehen.

4. superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen (c) ausgewählt sind unter

(i) den silikatgruppenhaltigen anorganischen Substanzen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukten,

(ii) den silikatgruppenhaltigen organischen Substanzen der allgemeinen Formel



worin

X eine reaktive funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal-, Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonat-, Alkoxy-, Alkylamino- und Alkylthiogruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxy- und der Alkylgruppe ausgewählt ist im Bereich von 1 bis 4;

R fehlt oder

R ist ein Polyalkylenlyglykol, ausgewählt unter einem Polyethylenlyglykol (PEG)n, einem mit Wasser mischbaren Polypropylenlyglykol (PPG)n oder einem mit Wasser mischbaren Block-Copolymerisat aus Polyethylenlyglykol (PEG) und Polypropylenlyglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten (PEG)a-(PEG)b, (PEG)a-(PPG)b-(PEG)a, (PPG)b-(PEG)a-(PPG)b wobei a eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 100 und b eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 20 darstellt; n ist eine positive ganze Zahl, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 300, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Blockcopolymerisat im Bereich von 3 bis 140; oder

R ist ein Kohlehydrat, wobei die Kohlehydratreste aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Maltitose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktosane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridensäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure, Alginsäure bestehen;

A ist eine Alkyl-, Alkoxy-, Acyl-, Alkylamin-, Alkylthiolgruppe, bei der die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkyl-, Alkoxy-, Acyl-, Alkylamin-, Alkylthiolgruppe im Bereich von 1 bis 4 liegt;

B ist eine Silantriol- oder eine Trialkoxysilangruppe, bei der die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxygruppe im Bereich von 1 bis 4 liegt.

5. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die

organischen Substanzen (c) ausgewählt sind unter polycarbonsäuregruppenhaltigen Kohlehydraten, wobei die Kohlehydratreste aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Maltitose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktosane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridensäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure, Alginsäure bestehen, und die polycarbonsäuregruppenhaltigen Kohlehydrate noch weitere reaktive funktionelle Gruppen besitzen können, die ausgewählt sind unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal-, Epoxy-, Thiol-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonatgruppe.

6. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die organischen Substanzen (c) ausgewählt sind unter den mercaptogruppenhaltigen Substanzen der allgemeinen Formel



worin

X eine reaktive funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal-, Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonat-, Alkoxy-, Alkylamino- und Alkylthiogruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxy- und der Alkylgruppe ausgewählt ist im Bereich von 1 bis 4;

R ist ein Polyalkylenlyglykol, ausgewählt unter Polyethylenlyglykolresten (PEG)n, mit Wasser mischbaren Polypropylenlyglykolresten (PPG)n oder mit Wasser mischbaren Block-Copolymerisaten aus Polyethylenlyglykol (PEG) und Polypropylenlyglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten (PEG)a-(PEG)b, (PEG)a-(PPG)b-(PEG)a, (PPG)b-(PEG)a-(PPG)b wobei a eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 100 und b eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 20 darstellt; n ist eine positive ganze Zahl, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 300, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Blockcopolymerisat im Bereich von 3 bis 140; oder

R ist ein Kohlehydrat, wobei die Kohlehydratreste aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Maltitose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktosane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridensäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure, Alginsäure bestehen; oder X-R-SH ist Mercaptopurin-, -cytosin-, -guanin-, -uracil-, -thymine-, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und deren Mercapto-desoxynucleoside.

7. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß an

die superparamagnetischen Teilchen

- (i) eine gewebespezifische Bindungssubstanz aus der Gruppe der Antigene, Antikörper, Ribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuren, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuresequenzen, Haptene, Protein A, Protein G, Endotoxin-bindende Proteine, Lectine, Selectine;
  - (ii) eine pharmakologisch wirksame Substanz aus der Gruppe der Antitumorproteine, Enzyme, Antitumorenzyme, Antibiotika, Pflanzalkaloide, Alkylierungsreagenzien, Antimetaboliten, Hormone und Hormonantagonisten, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren, Endotoxine, Lymphotoxine, Urokinase, Streptokinase, Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex, Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren, Desmodus-Plasminogen-Aktivatoren, Makrophagen-Aktivierungskörper, Antisera, Proteaseninhibitoren, radioaktiven Phosphor  $^{32}\text{P}$  enthaltene Stabilisatorsubstanzen, Tenside;
  - (iii) pharmakologisch wirksame Zellen aus der Gruppe der Organellen, Viren, Mikroben, Algen, Pilze, insbesondere Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Langerhans'sche Inseln;
  - (iv) pharmakologisch wirksamer Komplexbildner aus der Gruppe der Polycarbonsäuren, Aminocarboxylsäuren, Porphyrine, Katecholamine;
  - (v) zellfusionvermittelnde Substanzen chemisch gebunden sind.
8. Pharmakologisch wirksame Zubereitung, bestehend aus einem pharmakologisch annehmbaren Träger und superparamagnetischen Teilchen nach Anspruch 1 mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 nm, gegebenenfalls in Verbindung mit einer gewebespezifischen Bindungssubstanz, einer pharmakologisch wirksamen Substanz, einer pharmakologisch wirksamen Zelle, einem pharmakologisch wirksamen Komplexbildner oder einem Arzneimittel der in Anspruch 7 genannten Gruppen.
9. Verwendung einer pharmakologisch wirksamen Zubereitung nach Anspruch 8 zur Tumorschädigung und Immunsteigerung, gegebenenfalls unter Einwirkung von Magnetfeldern.

50

55

60

65